

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. K. G. Ober

MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG DER HYPOPHYSÄREN GONADOTROPINE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

HANS-JOACHIM THIEL

aus Bamberg

1973 # 386

Aus der Klinik für Geburtsfälle und Frauenheilkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. K. G. Oest

MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG
DER HYPOPHYSENER GEGENSTÄNDE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Verlag von J. Neumann, Neudamm

Herausgegeben von Dr. K. G. Oest

Erlangen-Nürnberg

Erlangen-Nürnberg

Verlag von J. Neumann

HANS JOACHIM THIEL

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. K. G. Ober

MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG DER HYPOPHYSÄREN GONADOTROPINE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

HANS-JOACHIM THIEL

aus Bamberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg.



Dekan: Prof. Dr. L. Demling

Referent: Prof. Dr. K.G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 10. 1973

In Dankbarkeit
meinem lieben Großvater,
meinen lieben Eltern
und meiner lieben Braut
gewidmet.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

INHALTSVERZEICHNIS	5
EINLEITUNG	9
TECHNIK DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR GONADOTROPINE	15
I. Biologische Bestimmungsmethoden	17
a) Extraktionsmethoden aus dem Urin	17
1. Kaolinacetatmethode nach Albert	17
2. Kaolinacetonmethode nach Loraine u. Brown	17
b) Extraktionsmethoden für Plasma	18
1. Acetonfällung nach Apostolakis	18
2. Alkohol-Amonioacetat-Methode nach Keller u. Rosenberg	19
c) Biologische Testung der gonadotropen Aktivität	19
1. Maus-Uterustest	19
2. Ratten-Ovartest	20
d) Berechnung der biologischen Ergebnisse	20
II. Immunologische Bestimmungsmethoden	21
a) Immunochemische Bestimmung hypophysärer Gonadotropine	21
b) Radioimmunologische Bestimmung	24
DISKUSSION. Gegenüberstellung der einzelnen Methoden	27
ZUSAMMENFASSUNG	37
LITERATURVERZEICHNIS	41

E I N L E I T U N G

Die grundlegenden Wirkungen der hypophysären Gonadotropine sind schon seit langem erforscht und werden auch klinisch angewendet. Manche Reaktionen dieser Hormone sind jedoch noch wenig bekannt. Die Ursache dafür ist in der Schwierigkeit zu sehen, diese Hormone genau zu bestimmen. In den letzten Jahren wurden jedoch methodische Fortschritte erzielt und neue Erkenntnisse erbracht, besonders im Hinblick auf die Probleme der medikamentösen Steuerung der menschlichen Fertilität und Sterilität.

Entwicklung der Gonadotropinforschung.

1910 wurde von CUSHING et al. (18) bei jungen weiblichen Versuchstieren nach durchgeführter Hypophysektomie außer anderen Erscheinungen auch Ovarienatrophie, Unterdrückung des Wachstums der Geschlechtsorgane und der sekundären Geschlechtsmerkmale beschrieben. EVANS u. LONG (21) zeigten 1921 luteinisierende Wirkung von Hypophysenextrakten im Rattenovar.

1926 konnten unabhängig voneinander ZONDEK u. ASCHHEIM (94) sowie SMITH (79) nachweisen, daß von der Hypophyse ein gonadenstimulierendes Hormon produziert wird.

1927 wies ASCHHEIM (8) im Urin von postmenopausalen Frauen ein follikelstimulierendes Hormon nach. Zur gleichen Zeit entdeckten ASCHHEIM u. ZONDEK (7,9) das placentäre Choriongonadotropin (HCG). Dieses Hormon wurde zunächst jedoch als hypophysäres Hormon angesehen. (68 a)

1930 wurde der Name Gonadotropine von WIESNER u. CREW (89) geprägt. Sie stellten schon die hypothetische Forderung auf, daß es ein follikelstimulierendes und ein luteinisierendes Hormon gäbe.

1931 gelang FEVOLD (24) die erste grobe chemische Trennung der hypophysären Gonadotropine in ein follikelstimulierendes

(FSH) und luteinisierendes (LH) Hormon. In der Folgezeit wurden verschiedene Methoden der Extraktion gonadotroper Hormone aus dem Urin erarbeitet, die jedoch sehr aufwendig und schwierig waren. Erst in den Jahren 1954 und 1955 wurde von ALBERT (1) und LORAINE u. BROWN (60) sowie von JOHNSON (40) eine Routinemethode beschrieben.

Erstmals 1940 gelang es mehreren Forschergruppen (34, 56, 78), tierisches LH weitgehend zu reinigen.

1949 konnten LI et al. (57) tierisches FSH rein darstellen. Die Reinigung menschlicher Gonadotropine gelang erst in späterer Zeit (13, 14, 58, 59 und 69).

Mit dem Bekanntwerden immunchemischer Reaktionen gewannen die hoch gereinigten Hormone besondere Bedeutung. Sie erlaubten dann auch eine Verfeinerung der Untersuchungsmethoden.

1960 wurde von WIDE u. GEMZELL (87) die immunchemische Haemagglutinationstechnik für den Nachweis von HCG beschrieben. Sie stellten eine Kreuzreaktion zwischen LH und HCG fest. Das bedeutet, daß ein Antikörper gegen LH auch mit HCG reagieren kann und umgekehrt. Somit war eine Bestimmungsmethode gleichzeitig für HCG und LH möglich geworden (86 und 19).

APOSTOLAKIS (6) konnte 1959 erstmals die hypophysären Gonadotropine im Plasma postmenopausaler Frauen quantitativ bestimmen.

1965 gelang KELLER u. ROSEMBERG (46) eine Extraktionsmethode, die den Nachweis der Gonadotropine im Plasma junger Frauen erlaubte.

Nachdem YALOW u. BERSON (93) 1960 die radioimmunologische Technik zur Bestimmung für Insulin im Serum angegeben hatten und 1962 HUNTER u. GREENWOOD (38) eine radioimmunologische Bestimmungsmethode für somatotropes Hormon (STH) angegeben hatten, folgte 1964 die Entwicklung der radioimmunologischen Bestimmungsmethode für HCG durch PAUL u. ODELL (68), für LH durch MIDGLEY (62) und durch ODELL et al. (64)

sowie durch FRANCHIMONT (27, 28 und 29). Erst 1967 wurde von MIDGLEY (63) und FAIMAN u. RYAN (22) sowie von SAXENA et al. (74) eine zuverlässige Methode für den radioimmunologischen Nachweis von FSH gefunden. Diese Entwicklung der Bestimmungsmethode für die quantitative Erfassung der Gonadotropine im Blut wie im Urin spielte eine ganz entscheidende Rolle in der Erforschung dieser Hormone (22, 62, 63, 64, 65, 74).

Die hypophysären Gonadotropine können auf drei verschiedene Arten bestimmt werden, nämlich biologisch, immunochemisch und radioimmunologisch.

Einmal ist es möglich, die gesamte oder totale gonadotrope Aktivität zu erfassen, die auf der kombinierten Wirkung des follikelstimulierenden und luteinisierenden Hormons beruht, zum anderen besteht die Möglichkeit, beide Hormone getrennt und weitgehend spezifisch nachzuweisen. All diese Bestimmungen sind sowohl im Urin wie auch im Plasma möglich.

In dieser Arbeit sollen die verschiedenen Untersuchungsmethoden miteinander verglichen und ihre jeweilige Bedeutung für den Kliniker wie für die Endokrinologie dargestellt werden.

TECHNIK DER UNTERSUCHUNGS -
METHODEN FÜR GONADOTROPINE .

I. Biologische Bestimmungsmethoden.

Bis etwa 1960 stellten die biologischen Bestimmungsmethoden die einzige Möglichkeit zur Erforschung der gonadotropen Hormone dar. Die biologische Gonadotropinbestimmung besteht aus zwei verschiedenen methodischen Schritten, einmal der Isolierung der gonadotropen Wirkstoffe aus dem Urin oder dem Plasma, dann der biologischen Testung der gewonnenen Extrakte.

a) Extraktionsmethoden aus dem Urin:

Hier werden nur die Methoden erwähnt, die heute allgemein verwendet werden und sich klinisch bewährt haben. Im Vordergrund stehen eine gute Konzentration des gonadotropen Materials, bei dem besonders toxische Störungen für die spätere Testung an Tieren eliminiert werden sollten, wie die spezifische Reinigung, die darauf abzielt, alle evtl. störenden Hormone aus der Extraktion zu entfernen.

1) Kaolinacetatmethode nach ALBERT (1).

Bei dieser Methode werden die gonadotropen Wirkstoffe an Kaoline in saurem Bereich bei einem bestimmten pH adsorbiert, anschließend mit Ammoniumhydroxyd wieder eluiert und mit Aceton ausgefällt. Zu diesem Zweck muß ein vollständig gesammelter 24-Stunden oder 48-Stunden-Urin zunächst mit Eisessig auf ein pH von 4,5 eingestellt werden. Es wird Kaolin zugesetzt, gründlich gemischt und filtriert. Das Filtrat wird anschließend mit Eisessig und Wasser (pH 4,5) gewaschen. Die an Kaolin gebundenen Gonadotropine werden mit NH_4OH eluiert. Dann erfolgt die Präzipitation mit Aceton, hierauf Waschen mit Alkohol und Äther. Die Extraktion nimmt unter günstigen Bedingungen etwa 40 bis 50 Minuten in Anspruch.

2) Kaolinacetonmethode nach LORAINÉ u. BROWN (60).

Im Gegensatz zu der vorher erwähnten Methode wird

hier der Urin mit HCL auf einen pH-Wert von 4 eingestellt, Kaolin zugegeben und geschüttelt. Dann wird zentrifugiert, auf ein pH von 5 eingestellt und mit Aceton versetzt. Das dabei sich bildende Präzipitat wird zentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Vergleichende Untersuchungen von LORAINÉ u. MACKAY (61), sowie HEINRICHS u. EULEFELD (37) zeigten in größeren Untersuchungen, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden nur gering sind. Bei anderen Verfahren, wie z.B. der Benzoe-Wolframsäure-Methode nach BUTT (17) und der Alkoholpräzipitation nach KLINEFELTER et al. (53) fallen die Vergleiche zum Teil ungünstiger aus, was besonders für die letztgenannte Methode gilt (44).

b) Extraktionsmethoden für Plasma:

Die Schwierigkeiten bei der Extraktion von Plasma oder Serum sind vergleichsweise sehr viel größer. Enorme inaktive Eiweißmengen müssen teilweise eliminiert werden, um überhaupt den kleinen Versuchstieren ausreichende Plasmaäquivalente applizieren zu können. Heute existieren zwei ausgearbeitete Methoden zur Plasmaextraktion, die aber lediglich kurz behandelt werden sollen, da sie nur für spezielle Fragestellungen Bedeutung haben.

1) Acetonfällung nach APOSTOLAKIS (6).

Citratplasma wird mit HCL auf ein pH von 5,0 gebracht und die Proteine samt den Gonadotropinen werden durch langsames Einfließen von einer bestimmten Menge Aceton gefällt. Nachdem die Mischung bei 2° C stehengelassen wurde, wird der Niederschlag abzentrifugiert und über CaCl_2 getrocknet. Der Extrakt wird dann in Aqua dest. aufgelöst und gegen physiologische Kochsalzlösung während 12 bis 18 Stunden dialysiert. Das Dialysat kann dann für die biologische Testung verwendet werden. Diese Me-

thode eignet sich nur für den Nachweis hoher Gonadotropintiter, da keine Konzentrierung vorgesehen ist.

2) Alkohol-Amonioacetat-Methode nach KELLER u. ROSEMBERG (46).

Bei dieser Methode werden die Plasmaproteine zunächst mit einer bestimmten Menge absoluten Alkohols gefällt. Das Präzipitat wird dann zweimal mit Amonioacetat in Äthanol in einem Homogenizer extrahiert und der Rückstand abzentrifugiert. Die Überstände, die mit Amonioacetat gesättigt wurden, werden mit einer bestimmten Menge absoluten Alkohols versetzt. Anschließend bleiben sie 24 Stunden im Kühlschrank stehen. Dann wird das Präzipitat abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und über CaCl_2 getrocknet.

Bei dieser Methode wird eine 10fache Konzentration der gonadotropen Aktivität erreicht. So ist die Testung bei jungen und postmenopausalen Frauen möglich.

Spezifische FSH- und LH-Bestimmungen sind aber nur in relativ großen Plasmapools möglich, da die Konzentration dieser Hormone zu gering ist. Die spezifischen Methoden zur Erfassung von FSH und LH sind für klinische Fragestellungen zu aufwendig, so daß für diese Zwecke im allgemeinen lediglich die kombinierte Wirkung dieser beiden Hormone, d.h. die totale gonadotrope Aktivität, bestimmt wird. Diese Testung erfolgt hauptsächlich nach zwei Methoden.

c) Biologische Testung der gonadotropen Aktivität:

Bei der biologischen Testung der gonadotropen Aktivität wird die Stimulierung einzelner Organe durch die Verabreichung der Extrakte gemessen, deren Gewinnung oben beschrieben wurde.

1) Maus-Uterustest. (44, 53, 70)

Bei dieser Bestimmung wird das Uterusgewicht von infantilen weiblichen Mäusen nach Verabreichung der Extrakte gemessen. Die Art und Größe der Mäuse ist standardisiert. Die Extrakte werden nach Lösung in Brovat oder Kochsalz in verschiedenen Dosen den Tieren gruppenweise in einem bestimmten Zeitraum verabfolgt. Die subcutanen Injektionen werden wiederholt. 1 bis 4 Tage nach der letzten Injektion werden die Tiere getötet und der Uterus exakt präpariert und gewogen. Aufgrund des mittleren Uterusgewichtes jeder Gruppe wird dann anhand einer Standardkurve umgerechnet. Man muß für Routinezwecke mindestens zwei bis drei Dosen verwenden, da die Konzentrationen ja vorher nicht bekannt sind.

2) Ratten-Ovartest. (52)

Bei diesem Versuch werden infantile weibliche Ratten mit einem Gewicht von 40 bis 60 g verwendet. Die Auflösung der Extrakte erfolgt wie beim Maus-Uterustest. Es werden an vier aufeinanderfolgenden Tagen subcutane Injektionen der Lösung vorgenommen. 24 Stunden nach der letzten Injektion erfolgt die Sektion der Tiere, wobei das Gewicht der stimulierten Ovarien von Bedeutung ist. Die Umrechnung erfolgt aufgrund einer Standardkurve.

d) Berechnung der biologischen Ergebnisse:

Die Ergebnisse der biologischen Verfahren können nur ausgewertet werden, wenn bei jeder Versuchsanordnung Standardgruppen mitgeführt werden. Es wird immer eine unbehandelte Gruppe, die aus 3 bis 6 Tieren besteht, als Kontrolle dienen. Ein Standardpräparat wird zwei bzw. drei weiteren Gruppen mit verschiedenen Dosen injiziert. Hieraus resultiert die Dosis-Wirkungskurve. Sie sollte für den gewählten Bereich möglichst geradlinig verlaufen. Die Dosierung ist abhängig von der Empfindlichkeit des Tierstammes. Die unbekannten Extrakte werden ebenfalls in zwei bis vier verschiedenen

Dosierungen injiziert, woraus dann die Dosis-Wirkungskurve resultiert. Im Idealfall läuft sie parallel zur Standardkurve.

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse schließt eine Reihe von statistischen Problemen ein. Es müssen neben der Berechnung des gesuchten Resultats, der Standardabweichung, der Präzision und der entsprechenden Vertrauensgrenzen auch die Gültigkeitskriterien, wie die Regression, Linearität, Parallelität der Wirkungskurven sowie die gleiche Wirkung von Standard- und Testpräparat geprüft werden. Außerdem müssen zur Berechnung bei allen Testsystemen die allgemeinen Zuverlässigkeitskriterien, wie Richtigkeit, Präzision, Spezifität und Empfindlichkeit einer Versuchstechnik bekannt sein.

Auf den statistischen Rechengang an dieser Stelle einzugehen, würde zu weit führen. Die grundlegenden Probleme sind bei BORTH et al. (10) zu finden.

II. Immunologische Bestimmungsmethoden.

Erst in neuerer Zeit wurden die immunologischen Methoden zur Bestimmung der Gonadotropine zu routinemäßig brauchbaren Methoden ausgearbeitet. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen einem unbekannten Hormon und einem spezifischen Antiserum, das durch Immunisierung von Meerschweinchen oder Kaninchen mit hoch gereinigtem Hormon gewonnen wird.

a) Immunochemische Bestimmung hypophysärer Gonodotropine.

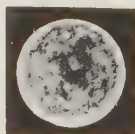
Durch WIDE u. GEMZELL (85) und WIDE (88) wurde ursprünglich eine Technik für die immunologische Erfassung von Choriongonadotropinen ausgearbeitet. Es wurde dann gefunden, daß zwischen HCG und LH eine Kreuzreaktion beobachtet werden kann, die das verwendete System auch für die Erfassung von LH geeignet erscheinen ließ. Zunächst mußte wegen der sehr geringen Konzentration des Hormons im Urin junger Patientinnen derselbe noch konzentriert

werden. SCHUURS (75) konnte dann durch eine Modifikation LH auch im nativen Urin bestimmen. Bei der immunologischen LH-Bestimmung beruht die Reaktion auf dem gleichen Prinzip wie beim immunologischen Schwangerschaftstest. Es tritt eine Reaktion zwischen dem zu bestimmenden LH, dem Antiserum und lyophilisierten, Antigen-beschichteten Erythrozyten ein. Statt der Antigen-beschichteten Erythrozyten können auch Antigen-beschichtete Latexpartikelchen benutzt werden. Wenn nun die Konzentration des LH bei einer bestimmten Verdünnung hoch genug ist, so wird das zugesetzte Antiserum gebunden und kann deshalb nicht mehr die Antigen-beschichteten Erythrozyten agglutinieren. Ist kein oder nur zu wenig LH vorhanden, so kann das freie Antiserum die Antigen-beschichteten Erythrozyten agglutinieren. Im speziellen Sedimenttierröhrchen aus Glas kann dann abgelesen werden, ob eine Agglutinationshemmung oder eine Agglutination erfolgt ist, wobei infolge der elektrostatischen Verhältnisse im positiven Fall ein braun-roter Ring am Boden der Ampulle entsteht, im negativen Fall ein diffuser Erythrozytenteppich gefunden wird (Abb.).



+

scharf abgegrenzter
bräunlicher Ring:
Positives Ergebnis



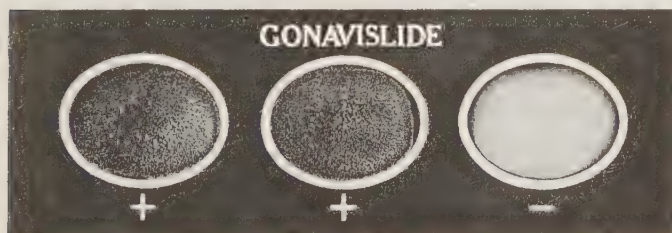
-

diffuse gelbliche
Ablagerung:
Negatives Ergebnis

Organon GmbH
8000 München 60
Perlschneiderstraße 1

Zur semiquantitativen Bestimmung von LH werden verschiedene Verdünnungen hergestellt und mit konstanten Mengen Antiserum vermischt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit (2 Stunden) wird eine Erythrozytensuspension oder Latexsuspension zugesetzt, nach Abwarten von 30 Minuten wird zentrifugiert, das Sediment gewaschen und quantitativ in spezielle Sedimentierröhrchen übergeführt. Nach 2 Stunden ist dann das Ergebnis abzulesen. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß die Röhrchen erschütterungsfrei stehen müssen. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgt am günstigsten mit Hilfe eines Spiegels, der unter die Röhrchen gebracht wird. So ist die Erschütterungsfreiheit am besten gewährleistet. Aufgrund der Verdünnung kann dann quantitativ die vorhandene LH-Menge berechnet werden.

Wie schon erwähnt, können statt der Erythrozyten auch Systeme mit Antigen-beschichteten Latexpartikeln verwendet werden (47, 80, 81). Bewährt hat sich hier besonders die Methode des Schwangerschaftstestes auf Objektträgern. Hier bleibt die Ringbildung aus (Abb.)



Für FSH ist eine immunochemische Bestimmung ähnlicher Prinzipien noch nicht bekannt. Hauptsächlich liegt das an der Schwierigkeit, Antikörper mit ausreichender Spezifität für dieses Hormon herzustellen.

b) Radioimmunologische Bestimmung.

YALOW u. BERSON (93) haben 1960 als erste eine radioimmunologische Technik für Insulin erarbeitet. In der Folge haben 1963 GLICK (30) sowie HAES u. RANDLE (35) ähnliche Methoden beschrieben.

1962 konnten HUNTER u. GREENWOOD (38) eine Methode für die Bestimmung des somatotropen Hormons (STH) im Plasma angeben.

1964 erfolgte dann die Entwicklung einer radioimmunologischen Methode für HCG durch PAUL u. ODELL (68).

1966 wurde von MIDGLEY (62), FRANCHIMONT (27) und 1967 von ODELL et al. (64) eine Methode zur Bestimmung von LH angegeben.

1967 wurde von MIDGLEY (63) und FAIMAN u. RYAN (22) sowie von SAXENA et al. (74) eine Methode für die radioimmunologische Bestimmung von FSH gefunden. Bei dieser Methode handelt es sich hauptsächlich um eine kompetitive Bindung des zu bestimmenden und des gleichen radioaktiv markierten reinen Hormons an ein spezifisches Antiserum. Das Grundprinzip entspricht dem der immunologischen Methode. Zunächst wird ein Antiserum bei Meerschweinchen oder Kaninchen hergestellt, das durch Einspritzung hoch gereinigter Hormone gewonnen wird. Wenn die Konzentration des Antikörpers bei den Kaninchen bzw. Meerschweinchen hoch genug ist, werden die Tiere ausgeblutet und das Serum als Antikörperserum verwendet. Dabei können Verdünnungen bis 1 : 125.000 verwendet werden, was jedoch von der Antikörperproduktion abhängig ist.

Als nächster Schritt wird ein hoch gereinigtes Hormon radioaktiv markiert. Das geschieht heute üblicherweise mit Jod-131, das eine Halbwertszeit von 8 Tagen hat oder mit Jod-125, bei dem die Halbwertszeit 60 Tage beträgt. Ist das Hormon jodiert, empfiehlt sich noch eine Reinigung mittels Gel-Filtration oder Sepha-

dex-Chromatographie. Das markierte Hormon wird dann mit dem zu bestimmenden Serum oder Urin und dem vorher gewonnenen Antikörper inkubiert. Als nächster Schritt wird das freie Hormon von dem Antikörper-gebundenen abgetrennt. Hierbei werden hauptsächlich Chromatoelektrophorese oder Doppelantikörperpräzipitation und das noch freie Hormon durch eine zweite Antikörperreaktion vom gebundenen abgetrennt. Anschließend wird dann die zurückgebliebene Radioaktivität in einem Gammastrahlenmeßgerät ermittelt. Die so erhaltenen Werte werden aufgrund einer Standardkurve umgerechnet.

In letzter Zeit wurden von verschiedenen Firmen die Methoden so weit vereinfacht, daß man sowohl die Antikörper, wie auch das markierte Hormon in lyophilisierter Form kaufen kann. Das bedeutet, daß die sehr schwierigen Präparationen wegfallen, so daß nur noch die Inkubation und die Antikörperabtrennung mit anschließender Messung durchgeführt werden müssen.

D I S K U S S I O N

Gegenüberstellung der einzelnen Methoden.

Bei der biologischen Methode werden größere Urinmengen benötigt, um eine genügend hohe Konzentration des Hormons zu erhalten. Eine Fehlermöglichkeit liegt in dem Sammeln von Urin über 48 Stunden.

Bei der Extraktion ist von Wichtigkeit, daß eine gute Konzentration des gonadotropen Materials erreicht wird. Man muß auch versuchen, die toxischen Störfaktoren zu eliminieren. Nicht selten kommt es vor, daß Versuchstiere durch die Toxizität des eingespritzten Materials zugrunde gehen. Vereinzelt ist die Durchführung des Versuches wegen der hohen Toxizität nicht möglich. Dies kann zum Beispiel durch die Einnahme von Medikamenten bedingt sein.

Der Maus-Uterustest ist einfach und empfindlich. Die Präzision liegt bei 0,06 bis 0,15 λ . Die größten Schwierigkeiten bietet die Wahl des Testbereiches, da die Dosiskurve sehr kurz und steil ist, so daß brauchbare Bereiche häufig über- oder unterschritten werden. Aus diesem Grunde muß man mindestens zwei bis drei Dosen verwenden. Dadurch steigt die Zahl der Versuchstiere erheblich an.

Der Ratten-Ovartest hat gegenüber dem Maus-Uterustest eine zehnmal geringere Empfindlichkeit. Die Präzision liegt bei 0,10 bis 0,24 λ . Die Dosiswirkungskurve ist steil und lang. Man muß also lediglich zwei Tiere für eine Bestimmung verwenden. Allerdings ist bei dieser Methode eine genaue Auswertung von hypogonadotropen Fällen sehr erschwert. Bei diesen Methoden ist die biologische Aktivität der Gesamt-Gonadotropine meßbar. Die Extraktion aus dem Plasma ist wegen der schwierigeren Methode und der größeren Menge an Plasma für Routinezwecke sicher nicht verwendbar.

Die immunologische Technik ist spezifisch und sehr empfindlich. Der Zeitbedarf dieses Versuches sowie der technische Aufwand ist gegenüber den biologischen Bestimmungen sehr viel geringer. Neben diesen Vorteilen ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei dieser Methode nur semiquantitative Analysen möglich sind. Zur Durchführung dieser Methode sind

hoch gereinigte, relativ schwierig zu gewinnende Hormone nötig, um eine ausreichende Spezifität der Bestimmung zu gewährleisten. Außerdem ist die immunologisch nachweisbare Hormonmenge nicht unbedingt der effektiven biologischen Wirkung gleichzusetzen, obwohl die Korrelation sehr gut ist (23, 51). Zudem sind die immunologischen Verfahren in erheblichem Maße störanfällig (ruhiges Stehen der Gläschen).

Die radioimmunologische Methode benötigt für ihre Reaktionen hoch gereinigte Hormone, nicht nur zur Herstellung von Antisera, sondern auch zur radioaktiven Markierung. Beide Verfahren tragen erhebliche Schwierigkeiten in sich. Die Spezifität der Methode ist gut, wenn man von der Kreuzreaktion zwischen HCG und LH absieht. Die Präzision gegenüber den beiden vorher erwähnten Methoden liegt zum Beispiel für HCG bei 0,01 bis 0,07 λ (90). Der technische Aufwand ist angesichts der Möglichkeit, schon markierte Hormone und vorgefertigte Antikörper zu bekommen, gegenüber den anderen Methoden sehr viel geringer und einfacher. Während bei einer LH-Bestimmung mit den üblichen biologischen Testverfahren mindestens 100 ml Plasma benötigt werden, reichen für den gleichen Zweck bei der radioimmunologischen Methode wenige 100 $\mu\ell$ völlig aus. Außerdem können Blut oder Serum verwendet werden. Vergleiche zwischen der radioimmunologischen und der biologischen Technik zur Erfassung der Gonadotropine im Urin und im Serum haben eine recht gute Übereinstimmung gegeben. Zu erwähnen ist, daß bei dieser Methode ein Gerät zur Messung der Gammastrahlen nötig ist, was einen nicht unerheblichen Kostenaufwand bedeutet.

Extraktion hypophysärer Gonadotropine aus

Urin nach ALBERT

Ansäuern des 24-h-Urins mit Eisessig auf pH 4,5 und Zusatz von
20 g Kaolin.



3 min. mit Magnetrührer mischen



Abfiltrieren des Urins in automatischem Schnellfilter
(Spincraft) und Waschen des Filterkuchens mit

2 l Wasser pH 4,5



Elution der Gonadotropine mit 100 ml 2_M NH₄OH, das zweimal durch-
gepreßt wird.



Nachspülen mit 30 ml Aqua dest.



Adjustieren mit Eisessig auf pH 5,5 und Präzipitation mit 2 Volumen
Azeton



Nach 30 min. Stehen bei 4° Abzentrifugieren und Trocknen des Präzipitates.

Gebräuchliche biologische Gonadotropin-Bestimmungsmethoden

Test	Spezifi- tät	Endpunkt	Test- dauer	Empfind- lichkeit	Präzision
Maus-Uterus- Test	TGA	Uterusgewicht infantiler Mäuse	3	0,03 mg-Äq. 2. IRP	0,06 - 0,15
Ratten-Ovar- Test	TGA	Ovargewicht infantiler Ratten	3 1/2	0,2-0,4 mg-Äq. 2. IRP	0,10 - 0,24

Immunochemische Bestimmung von LH

Zu einer in Zentrifugengläschen gegebenen konstanten Menge Antiserum verschiedene mit Pufferlösung hergestellte Verdünnungen des zu untersuchenden, filtrierten Urins zupipettieren



Nach guter Mischung 2 - 4 h stehenlassen



Zupipettieren einer konstanten Menge frisch zubereiteter Erythrozytensuspension.



Nach guter Mischung 1/2 bis 1 h stehenlassen



Abzentrifugieren bei niedriger Tourenzahl, Verwerfen des Überstandes, Resuspension der Erythrozyten in Pufferlösung und erneutes Zentrifugieren

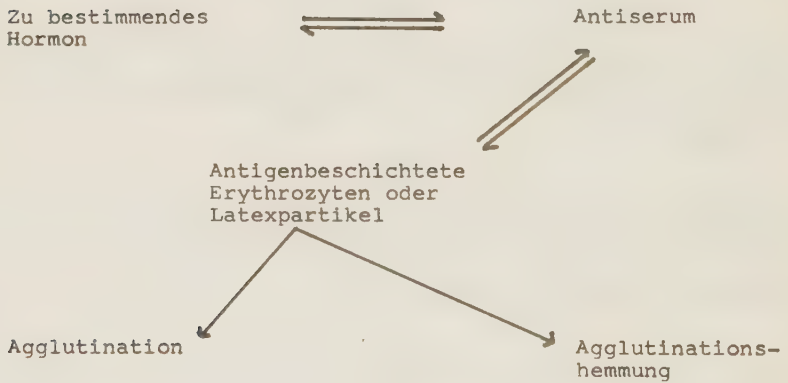


Nach Verwerfen des Überstandes Resuspension der Erythrozyten in Pufferlösung, Überführen in spezielle Sedimenttierröhrchen und Einsetzen derselben in hierfür vorgesehenes Gestell

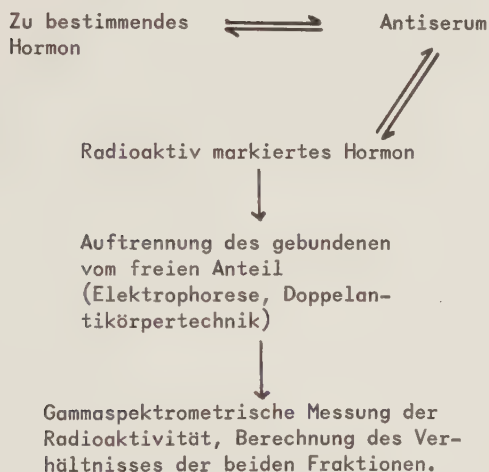


Nach kurzem Schütteln des Ständers 2 h erschütterungsfrei stehenlassen, dann Ablesen des Resultates in einem Spiegel.

Prinzip der immunochemischen Bestimmung von hypophysären
Gonadotropinen



Prinzip der radioimmunologischen Bestimmung von FSH und LH



Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Methoden der Bestimmung hypophysärer Gonadotropine ist zu erkennen, daß die biologische Methode sehr große Schwierigkeiten in sich birgt. Einmal das unzuverlässige Urinsammeln, zum anderen die Toxizität des Extraktes; außerdem ist mit der biologischen Methode nur eine Messung der gesamten Gonadotropine möglich. Man kann auch nur eine Aussage über den Hormonspiegel während längerer Zeit, etwa 24 bzw. 48 Stunden, machen. Als entscheidender Vorteil ist jedoch zu nennen, daß mit der biologischen Bestimmungsmethode der genaueste Aufschluß über die zu erwartende Wirkung am Organismus zu erkennen ist.

Bei der immunologischen Methode ist es möglich, wenn auch semiquantitativ, Aufschluß über einen aktuelleren Hormonwert zu bekommen, weil man auch aus einzelnen Urinportionen Bestimmungen durchführen kann. Die Störanfälligkeit ist gegenüber den Schwierigkeiten bei der biologischen Methode sicherlich in Kauf zu nehmen. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist der geringere zeitliche Aufwand.

Bei der radioimmunologischen Technik ist es möglich, aus ganz geringen Plasmamengen, gegebenenfalls auch aus dem Urin, aktuelle Hormonbestimmungen sowohl von FSH wie von LH durchzuführen. Bei der hohen Präzision und der Möglichkeit, noch 10^{-12} genau zu bestimmen, bietet diese Methode gegenüber den beiden vorher erwähnten ganz erhebliche Vorteile. Man kann hier die Reaktionen der Hypophyse verfolgen und auch therapeutische Effekte sofort nachweisen.

In Zukunft wird sehr viel mehr auf die radioimmunologische Methode wegen der Einfachheit, des geringeren zeitlichen Aufwandes sowie der größeren Präzision zurückgegriffen werden, jedoch kann die biologische Methode niemals ganz verlassen werden, weil hierbei die biologische Aktivität gemessen werden kann. Allerdings wird diese Methode eben nur noch in Sonderfällen angewendet werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Albert, A.:
Procedure for routine clinical determination of urinary gonadotropin.
Proc. Mayo Clin. 30: 552 (1955).
2. Albert, A. and Derner, I.:
Studies on the biological characterization of human gonadotropins: VI. Nature and number of gonadotropins in human pregnancy urine.
J. clin. Endocrin. 20: 1225 (1960).
3. Albert, A.; Stellmacher, V., and Leiferman, J.:
Method of purification of human pituitary gonadotropin for clinical assays.
J. clin. Endocrin. 21: 856 (1961).
4. Albert, A.; Derner, I.; Stellmacher, V.; Leiferman, J. and Barnum, J.:
Purification of pituitary gonadotropin from urine of postmenopausal women.
J. clin. Endocrin. 21: 1260 (1961).
5. Albright, F.; Butler, A.M.; Hampton, A.O., and Smith, P.:
Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females; Report of 5 cases.
New Engl. J. Med. 216: 727 (1937).
6. Apostolakis, M.:
Detection and estimation of pituitary gonadotropins in human plasma.
J. Endocrin. 19: 377 (1959).
7. Aschheim, S. und Zondek, B.:
Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren.
Klin. Wschr. 6: 1322 (1927).

8. Aschheim, S.:
Berliner gyn. Ges. 14. Dez. 1928 zit. C. Hamburger
Gonadotropins, Ciba Foundation Study Group 22, p. 4
(Churchill, London 1965).
9. Aschheim, S. und Zondek, B.:
Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn.
Klin. Wschr. 7: 8 (1928).
10. Borth, R.; Diczfaluzy, E. und Heinrichs, H. D.:
Grundlagen der statistischen Auswertung biologischer
Bestimmungen.
Arch. Gynäk. 188: 497 (1957).
11. Borth, R. and Menzi, A.:
Comparison of five methods for the extraction of human
pituitary gonadotrophin from urine.
Acta endocrin., Kbh. Suppl. 90: 17 (1964).
12. Bourrillon, R.; Got, R. and Merey. R.:
Preperation of a highly purified sample of urinary
gonadotrophin.
Nature, Lond. 184: 983 (1959).
13. Bourrillon, R.; Got, R. et Merey. R.:
Isolement et quelques caractéristiques d'une gonado-
trophine urinaire de ménopause homogène à l'électrophorèse.
Acta endocrin., Kbh. 35: 225 (1960).
14. Bradbury, J. T.; Brown, E. S., and Brown, W. E.:
Adsorption of urinary gonadotrophins on kaolin.
Proc. Soc. exp. Biol. NY 71: 228 (1949).
15. Brown, P. S.:
The assay of gonadotrophin from urine of non-pregnant
human subjects.
J. Endocrin. 13: 59 (1955).

16. Butt, W. R.:
The extraction of gonadotrophins from urine by the
combined use of benzoic acid and tungstic acid.
J. Endocrin. 17: 143 (1959).
17. Butt, W. R., Crooke, A. C., and Cunningham, F. J.:
Studies on the human urinary and pituitary gonado-
trophins.
Biochem. J. 81: 596 (1961).
18. Cushing: zit. nach Hanč (36).
19. Daume, E.; Kaiser, R. und Geiger, W.:
Zur immunhämатologischen Bestimmung hypophysärer
Gonadotropine aus dem Urin.
Klin. Wschr. 42: 242 (1964).
20. Endrőczi, E. and Hillard, J.:
Luteinizing hormone releasing activity in different
parts of rabbit and dog brain.
Endocrinology 77: 667 (1965).
21. Evans, H. M. and Long, J. A.:
Anat.
Res. 21: 62 (1921). cit. C. Hamburger In:
Gonadotropins, Ciba Foundation Study Group 22, p. 3
(Churchill, London 1965).
22. Faiman, C. and Ryan, R. J.:
Radioimmunoassay of human follicle-stimulating hormone.
J. clin. Endocrin. 27: 447 (1967).
23. Faiman, C.; Ryan, R. J., and Albert, A.:
FSH and LH activity in urinary extracts. A comparison
of radioimmunoassay and bioassay methods.
J. clin. Endocrin. 28: 1076 (1968).

24. Fevold, H. L.; Hisaw, F. L., and Leonard, S. L.:
Gonad stimulating and luteinizing hormone of anterior
lobe of hypophysis.
Amer. J. Physiol. 109: 655 (1934).
25. Fevold, H. L. and Hisaw, F.L.:
Interactions of gonad stimulating hormone in ovarian
development.
Amer. J. Physiol. 109: 655 (1934).
26. Fluhmann, C. F.:
Anterior pituitary hormone in blood of women with ovarian
deficiency.
J. amer. med. Ass. 93: 672 (1929).
27. Franchimont, P.:
Dosage radioimmunologique de l'hormone folliculo-stimulante
et luteinisante.
Proc. int. Soc. Endocrin. January 1966.
28. Franchimont, P.:
Dosage des hormones hypophysaires somatotrope et gonadotrope
et son application en clinique
(Arscia, Bruxelles 1966).
29. Franchimont, P.:
In E. T. Bell and J. A. Loraine:
Recent research on gonadotrophic hormones, p. 105
(Livingstone, Edinburgh/London 1967).
30. Glick, S. M.; Roth, J.; Yalow, R. S., and Berson, S. A.:
Immunoassay of human growth hormone in plasma.
Nature, London 199: 784 (1963).
31. Gorbmann, A.:
Ultrafiltration of urine for collection and biological
assay of extracted hypophyseal hormones.
Endocrinology 37: 177 (1945).

32. Goss, D. A. and Taymor, M. L.:
Measurement of LH-activity by latex-HCG agglutination.
Endocrinology 71: 321 (1962).
33. Greenwood, F. C.; Hunter, W. M., and Glover, J. S.:
Preparation of J 131 labelled human growth hormone of
high specific radioactivity.
Biochem. J. 89: 114 (1963).
34. Greep, R. O.; van Dyke, H. B., and Chow, B. F.:
Gonadotropins of swinepituitary; various biological
effects of purified thylokentrin (FSH) and pure meta-
kentrin (ICSH).
Endocrinology 30: 635 (1942).
35. Hales, C. H. and Randle, P. D.:
Immunoassay of insulin antibody precipitate.
Biochem. J. 88: 137 (1963).
36. Hanč, O.:
Hormone
Fischer Verlag, Jena, 1959.
37. Heinrichs, H. D. und Eulefeld, F.:
Untersuchungen über die Extraktion von hypophysären
Gonadotropinen aus dem Urin.
Acta endocrin, Kbh., Suppl. 53: 1 (1960).
38. Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.:
Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone
of high specific activity.
Nature, Lond. 194: 495 (1962)
39. Igarashi, M. and McCann, S. M.:
A new sensitive bio-assay for follicle-stimulating
hormone (FSH).
Endocrinology 74: 440 (1964).

40. Johnson, S. G.:
A clinical routine method for the quantitative determination of gonadotrophins in 24-hour urine samples.
Acta endocrin., Kbh. 28: 69 (1958).
41. Johnson, S. G.:
A clinical routine method for the determination of gonadotrophins in 24-hour urine samples. II. Normal values for men and women at all age groups from pre-puberty to senescence.
Acta endocrin, Kbh. 31: 209 (1959).
42. Katzmann, P. A. and Doisy, E. A.:
Quantitative determination of small amounts of gonadotropic material.
J. biol. Chem. 106: 125 (1934).
43. Katzmann, P. A.; Godfrid, M.; Cain, C. K., and Doisy, E. A.:
Preparation of chorionic gonadotropin by chromatographic adsorption.
J. biol. Chem. 148: 501 (1943).
44. Keller, P. J.:
Die Bestimmung hypophysärer Gonadotropine im Urin.
Gynaecologia 156: 380 (1963).
45. Keller, P. J.:
Some observations on the ovarian ascorbic acid depletion assay for luteinizing hormone employing immature female mice.
Endocrinology 76: 165 (1965).
46. Keller, P. J. and Rosemberg, E.:
Estimation of pituitary gonadotropins in human plasma.
J. clin. Endocrin. 25: 1050 (1965).

47. Keller, P. J.:
Qualitative und quantitative Choriogonadotrophinbestimmung mit dem Gravindex-Test.
48. Keller, P. J.:
Studies on pituitary gonadotrophins in human plasma.
I. Normal values in men and women of all ages.
Acta endocrin., Kbh. 52: 341 (1966).
49. Keller, P. J.:
Studies on pituitary gonadotrophins in human plasma.
II. Follicle-stimulating and luteinizing hormone in male and female plasma.
Acta endocrin., Kbh. 52: 348 (1966).
50. Keller, P. J.:
The renal clearance of follicle-stimulating and luteinizing hormone in postmenopausal women.
Acta endocrin., Kbh. 53: 225 (1966).
51. Keller, P. J.:
Comparison between an immunochemical and two biological assays for estimation of pituitary gonadotrophins.
Acta endocrin., Kbh. Suppl. 141: 63 (1970).
52. Keller, P. J.:
Hypophysäre Gonadotropine.
Fortschr.d.Geburtsh. u. Gynäkologie Vol 44, 1970.
53. Klinefelter, H. F.; Albright, F., and Griswold, G. C.:
Experience with a quantitative test for normal and decreased amounts of follicle-stimulating hormone in the urine in endocrinological diagnosis.
J. clin. Endocrin. 3: 529 (1943).
54. Lamond, D. R. and Binden, B. M.:
The biological assay of follicle-stimulating hormone in hypophysectomized immature mice.
J. Endocrin. 34: 365 (1966).

55. Levin, L. and Tyndale, H. H.:
Concentration and purification of gonadotropic substance in urine of ovariectomized and postmenopausal women.
Proc. Soc. exp. Biol., NY 34: 516 (1936).
56. Li, C. H.; Simpson, M. E., and Evans, H. M.:
Interstitial cell stimulating hormone; method of preparation and some physico-chemical studies.
Endocrinology 27: 803 (1940).
57. Li, C. H.; Simpson, M. E., and Evans, H. M.:
Isolation of pituitary follicle-stimulating hormone (FSH)
Science 109: 445 (1949).
58. Li, C. H.:
Purification and preparation of human pituitary follicle-stimulating and interstitial cell-stimulating hormones.
Arch. Biochem. 86: 110 (1960).
59. Li, C. H.:
Purification of follicle-stimulating hormone from human pituitary gland.
Proc. Soc. exp. Biol. NY 98: 839 (1958)
60. Loraine, J. A. and Brown, J. B.:
Some observations on the estimation of gonadotrophins in human urine.
Acta endocrin., Kbh. 17: 250 (1954).
61. Loraine, J. A. and Mackay, M. A.:
A comparison of various extraction methods for urinary gonadotrophins with special reference to yield.
J. Endocrin. 22: 277 (1961)
62. Midgley, R. A.:
Radioimmunoassay: A method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone.
Endocrinology 79: 10 (1966).

63. Midgley, R. A.:
Radioimmunoassay for human follicle-stimulating hormone.
J. clin. Endocrin. 27: 295 (1967).
64. Odell, W. D.; Ross, G. T., and Rayford, P. C.:
Radioimmunoassay for luteinizing hormone in human plasma
or serum.
Physiological studies. J. clin. Invest. 46: 248 (1967).
65. Odell, W. D. and Parlow, F.:
Radioimmunoassay for human follicle-stimulating hormone.
Clin. Res. 15: 125 (1967).
66. Parlow, A. F.:
A rapid bioassay method for luteinizing hormone and factors
stimulating LH secretion.
Fed. Proc. 17: 402 (1958).
67. Parlow, A. F.:
Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion
of ovarian ascorbic acid; in A. Albert Human pituitary
gonadotropins, p. 300
(Thomas, Springfield 1961).
68. Paul, W. E. and Odell, W. D.:
Radiation inactivation of the immunological and biolo-
gical activities of human chorionic gonadotropin.
Nature, Lond. 203: 979 (1964).
69. Roos, P.:
Human follicle-stimulating hormone.
Acta endocrin., Kbh. Suppl. 81: 1 (1968).
70. Rosemberg, E.; Smith, F., and Dorfman, R. J.:
A precise method for the bioassay of urinary gonadotropin
with a suggestion for a stable, easily available reference
standard.
Endocrinology 61: 337 (1957).

71. Rosenberg, E. and Keller, P. J.:
Studies on the urinary excretion of follicle-stimulating and luteinizing hormone activity during the menstrual cycle.
J. clin. Endocrin. 24: 1262 (1965).
72. Rosenberg, E.; Keller, P. J.; Bulat, G., and Ferrechio, G.:
Studies related to the presence of a gonadotrophin inhibiting material in human urine.
J. clin. Endocrin. 25: 1609 (1965).
73. Rosenberg, E.:
In E. T. Bell and J. A. Loraine Recent research on gonadotrophic hormones, p. 15
(Livingstone, Edinburgh/London 1967).
74. Saxena, B. B.; Denver, H.; Gandy, H. M., and Petersen, R.E.:
Radioimmunoassay of human follicle-stimulating and luteinizing hormones in plasma.
J. clin. Endocrin. 28: 519 (1968).
75. Schuurs, A. H. W. M.:
Estimation of LH in unconcentrated urine using a variation on the passive hemagglutination inhibition reaction.
Acta endocrin., Kbh., Suppl. 19: 129 (1967).
76. Schuurs, A. H. W. M. and van Wijngarden, C. J.:
A modified haemagglutination inhibition test and its application for the estimation of human luteinizing hormone in unconcentrated urine.
Acta endocrin., Kbh. Suppl. 141: 13 (1970).
77. Scott, L. D.:
Concentration and detoxification of human urine for biological pregnancy diagnosis.
Brit. J. exp. Path. 21: 320 (1941).
78. Sheldlovsky, T.; Rathen, H.; Greep, R. O.; van Dyke, H. B., and Chow, B. F.:
Isolation in pure form of interstitial-cell-stimulating

(luteinizing) hormone of anterior lobe of pituitary gland.
Science 92: 178 (1940).

79. Smith, P. E.:
Hastening development of female genital system by daily
homoplastic pituitary transplants.
Proc. Soc. exp. Biol. NY 24: 131 (1926).
80. Spadoni, R. L.; McLean, R. B., and Herrmann, W. L.:
A rapid immunological test for the detection of early
pregnancy.
West. J. Surg. 72: 92 (1964).
81. Steelman, S. L. and Pohley, F. M.:
Assay of the follicle-stimulating hormone based on the
augmentation with human chorionic gonadotropin.
Endocrinology 53: 604 (1953).
82. Stevens, V. C.:
In E. T. Bell and J. A. Loraine Recent research on gona-
dotrophic hormones
(Livingstone, Edinburgh/London 1967).
83. Utiger, R. D.; Parker, M. L., and Daughaday, W. H.:
Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay
for human growth hormone.
J. clin. Invest. 41: 1254 (1962).
84. Walter, K. und Heege, M.:
Methodik zur Routine-Gonadotropinbestimmung im Plasma
des nichtschwangeren Menschen;
in H. Nowakowski 8. Symposion Dtsch.Ges.Endokrin.
(Springer, Berlin 1964).
85. Wide, L. and Gemzell, C. A.:
An immunological pregnancy test.
Acta endocrin., Kbh. 35: 261 (1960).

86. Wide, L.; Roos, P., and Gemzell, C.:
Immunological determination of human pituitary
luteinizing hormone (LH).
Acta endocrin., Kbh. 37: 445 (1961).
87. Wide, L. and Gemzell, C.:
Immunological determination of pituitary luteinizing
hormone in the urine of fertile and postmenopausal
women and adult men.
Acta endocrin., Kbh. 39: 539 (1962).
88. Wide, L.:
An immunological method for the assay of human
chorionic gonadotrophin.
Acta endocrin., Kbh., Suppl. 70: 41 (1962).
89. Wiesner, B. P. and Crew, F. A. E.:
On separation of kyogenic hormone from human placenta.
Proc. roy. Soc. Edinb. 50: 79 (1930).
90. Wilde, C. E.; Orr, A. H., and Bagshawe, K. D.:
A sensitive radioimmunoassay for human chorionic gonado-
trophin and luteinizing hormone.
J. Endocrin. 37: 23 (1967).
91. Witschi, E.:
Bioassay for FSH content of human hypophyses; in A.
Albert Human pituitary gonodotropins, p. 349
(Thomas, Springfield 1961).
92. Yahia, C. and Taymor, M. L.:
A 3 min immunologic pregnancy test.
Obstet. Gynec., NY 23: 36 (1964).
93. Yalow, R. S. and Berson, S. A.:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in men.
J. clin. Invest. 39: 1157 (1960).

94. Zondek, B. and Aschheim, S.:
Das Hormon des Hypophysenvorderlappens; Testobjekt zum
Nachweis des Hormons.
Dtsch. med. Wschr. 52: 343 (1926).
95. Zondek, B.:
Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens
(Springer, Wien 1935).
- 68a. Philipp, E. und Huber, H.:
Die hormonale Rolle der Decidua. Ein Beitrag zur Frage
der Herkunft des Schwangerschaftshormons.
Zbl. Gynäk. 60: 2706 (1936)

D A N K E S W O R T

Herrn Professor Dr. K.G. Ober bin ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation zu großem Dank verpflichtet.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. H. Becker, der mir als Wissenschaftlicher Assistent von Herrn Professor Dr. K.G. Ober zu jeder Zeit mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand. In selbstloser Weise hat er sich um das Gelingen der Doktorarbeit bemüht und ist mir in meinen Wünschen freundlich entgegengekommen.

LEBENS LAUF

Ich, Hans-Joachim Thiel, wurde am 12. 1. 1948 als Sohn des Arztes für Allgemeinmedizin Dr. med. Helmut Thiel und seiner Ehefrau Anne Marie, geborene Schübel, in Bamberg geboren.

Mit sechs Jahren trat ich am 1. 9. 1954 in Bamberg in die "Domschule" ein, wo ich vier Jahre lang die Grundschule besuchte. Am 15. 5. 1958 wechselte ich an das humanistische "Alte Gymnasium", das spätere "Kaiser-Heinrich-Gymnasium", in Bamberg über. Nach neun Jahren legte ich am 21. 7. 1967 an dieser Schule das Zeugnis der Reife ab.

Zum Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg als Student der Medizin. Von 1967 bis 1973 habe ich an dieser Universität elf Semester lang Medizin studiert. Den naturwissenschaftlichen Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung habe ich am 31. 7. 1968, die ärztliche Vorprüfung am 26. 2. 1970 und die ärztliche Prüfung am 3. 8. 1973 bestanden.

1. Die...
2. Die...
3. Die...
4. Die...
5. Die...
6. Die...
7. Die...
8. Die...
9. Die...
10. Die...
11. Die...
12. Die...
13. Die...
14. Die...
15. Die...
16. Die...
17. Die...
18. Die...
19. Die...
20. Die...
21. Die...
22. Die...
23. Die...
24. Die...
25. Die...
26. Die...
27. Die...
28. Die...
29. Die...
30. Die...
31. Die...
32. Die...
33. Die...
34. Die...
35. Die...
36. Die...
37. Die...
38. Die...
39. Die...
40. Die...
41. Die...
42. Die...
43. Die...
44. Die...
45. Die...
46. Die...
47. Die...
48. Die...
49. Die...
50. Die...
51. Die...
52. Die...
53. Die...
54. Die...
55. Die...
56. Die...
57. Die...
58. Die...
59. Die...
60. Die...
61. Die...
62. Die...
63. Die...
64. Die...
65. Die...
66. Die...
67. Die...
68. Die...
69. Die...
70. Die...
71. Die...
72. Die...
73. Die...
74. Die...
75. Die...
76. Die...
77. Die...
78. Die...
79. Die...
80. Die...
81. Die...
82. Die...
83. Die...
84. Die...
85. Die...
86. Die...
87. Die...
88. Die...
89. Die...
90. Die...
91. Die...
92. Die...
93. Die...
94. Die...
95. Die...
96. Die...
97. Die...
98. Die...
99. Die...
100. Die...

